

Determining genetic disposition to thrombosis, by testing for presence of at least two allelic polymorphisms associated with increased risk, followed by multifactorial analysis of the results

Publication number: DE10237073

Publication date: 2004-02-19

Inventor: CULLEN PAUL (DE); SEEDORF UDO (DE)

Applicant: OGHAM GMBH (DE)

Classification:

- international: C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68; C07H21/00

- european: C12Q1/68M6

Application number: DE20021037073 20020809

Priority number(s): DE20021037073 20020809

Also published as:

EP1398388 (A2)

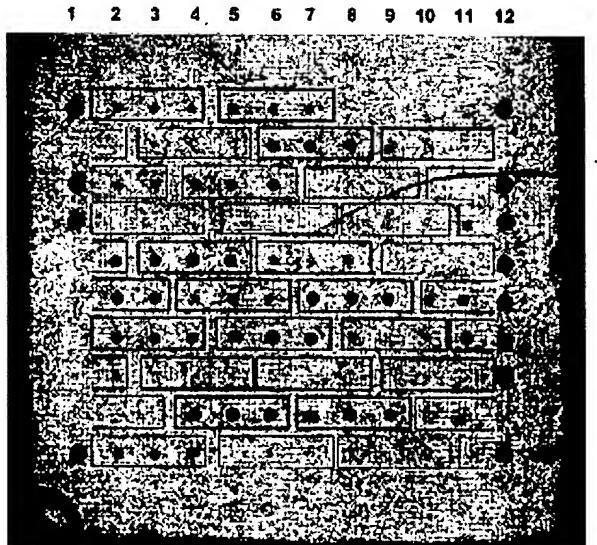
EP1398388 (A3)

[Report a data error here](#)

Abstract of DE10237073

Determining the genetic predisposition of a subject for development of thrombosis comprises examining at least 2 nucleic acid segments (A) from the genome, followed by multifactorial analysis of the results. (A) can contain allelic polymorphisms whose presence is correlated with an increased risk of thrombosis.

Independent claims are also included for: (1) 154 specific oligonucleotides (ON) (all sequences fully defined in the specification); and (2) a set of oligonucleotides (14 pairs listed) for use as primers for amplification of thrombosis-associated polymorphisms.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 37 073 A1 2004.02.19

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 37 073.7

(51) Int Cl.⁷: C12Q 1/68

(22) Anmeldetag: 09.08.2002

C07H 21/00

(43) Offenlegungstag: 19.02.2004

(71) Anmelder:
OGHAM GmbH, 48149 Münster, DE

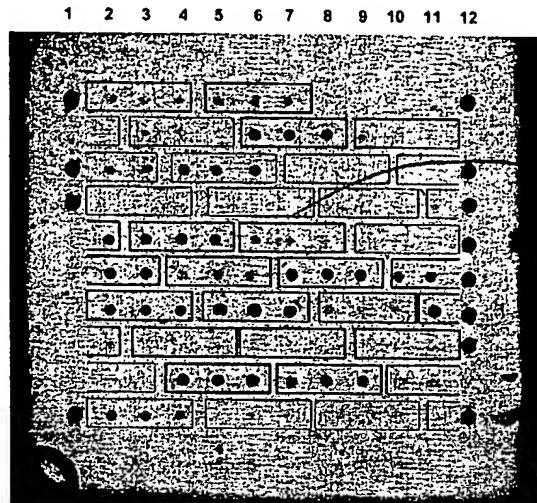
(72) Erfinder:
Cullen, Paul, 48149 Münster, DE; Seedorf, Udo,
48149 Münster, DE

(74) Vertreter:
König Szynka von Renesse, 40549 Düsseldorf

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Methode zur Bestimmung eines erblichen Thromboserisikos mit DNA-arrays

(57) Zusammenfassung: Verfahren zum Bestimmen der genetischen Disposition zur Thromboseneigung eines Patienten durch die Untersuchung mindestens zweier Nukleinsäureabschnitte aus dem Genom des Patienten und deren ausschließliche multifaktorielle Auswertung, wobei die Nukleinsäureabschnitte allelische Polymorphismen umfassen können, deren Vorhandensein im menschlichen Genom mit einer erhöhten Thromboseneigung korreliert.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Methode zur Untersuchung von Nukleinsäure-Polymorphismen, die mit dem erblichen Thromboserisiko korrelieren.

[0002] Tiefe Beinvenenthrombosen sind häufig: sie treten bei ungefähr zwei von tausend Personen irgendwann im Laufe ihres Lebens auf. Solche tiefen Venenthrombosen sind oft mit ernsten Komplikationen verbunden. Zum einen wird durch eine Venenthrombose der Blutfluß beeinträchtigt, was zu einer schmerzhaften Schwellung führt. Außerdem kommt es zu einer lokalen Endzündungsreaktion. Zum anderen können sich Gerinnselfragmente oder der ganze Thrombus am Entstehungsort ablösen und mit dem venösen Blutstrom in die rechte Herzkammer und schließlich in die Pulmonalarterie gelangen. Diese Komplikation, eine sogenannte Lungenembolie, geht häufig mit einer drastischen Abnahme der Lungendurchblutung sowie des Gasaustausches einher und führt oft zum plötzlichen Tod des Betroffenen. Jedes Jahr versterben 40000 Personen in Deutschland an den Folgen einer Lungenembolie.

[0003] In der Regel entsteht eine Thrombose entweder durch die pathologische Bildung eines Thrombus in Folge eines Defekts der Blutgerinnungskaskade oder durch eine Störung der Thrombolyse.

[0004] Das Gerinnungssystem im Plasma setzt sich aus verschiedenen enzymatischen Reaktionen zusammen, die schließlich zur Umwandlung von löslichem Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin führen. Durch die Vernetzung des Fibrins entsteht der eigentliche Thrombus. Ein funktionierendes Blutgerinnungssystem ist lebenswichtig. Ohne Blutgerinnung würden selbst kleinste Verletzungen zu schwersten Blutungen führen. Die beteiligten Reaktionen müssen jedoch einer strengen räumlichen und zeitlichen Kontrolle unterliegen. Ein Blutgerinnselfragment darf nur dann entstehen, wenn eine Verletzung des Organismus vorliegt und muß außerdem auf die Verletzungsstelle beschränkt bleiben, um nicht den gesamten Blutkreislauf zu beeinträchtigen.

[0005] Die Gerinnungskaskade wird durch die Bindung von aktiviertem Faktor VII (FVIIa) an Gewebsfaktor (TF) ausgelöst. Gewebsfaktor ist ein membranständiges Protein, das erst durch die Verletzung des Endothels zugänglich wird. Der TF-VIIa-Komplex katalysiert eine limitierte Proteolyse der Proenzyme Faktor IX und Faktor X und wandelt diese in ihre aktiven Formen um (1). Aktivierter Faktor IX (FIXa) bindet an seinen Kofaktor VIIIa, dessen aktivierte Form aus dem Proenzym Faktor VIII entsteht. Der IXa-VIIIa-Komplex aktiviert Faktor X sehr viel schneller als der TF-VIIa-Komplex. Somit kommt es zu einer verstärkten Bildung von aktiviertem Faktor X (FXa), der wiederum an seinen Kofaktor, aktivierte Faktor V (FVa), bindet, um so den Prothrombinase-Komplex zu bilden. Durch diesen Komplex wird Prothrombin (Faktor II, FII) proteolytisch in Thrombin umgewandelt. Thrombin wandelt lösliches Fibrinogen in unlösliches Fibrin um, wodurch ein Blutgerinnselfragment entsteht (2,3). Neben der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, spaltet Thrombin Faktor V zu FVa und Faktor VIII zu FVIIIa. Außerdem wird auch Faktor IX möglicherweise von Thrombin aktiviert (4).

[0006] Die strenge zeitliche und räumliche Begrenzung der Gerinnungskaskade wird durch eine zweite Kaskade gerinnungshemmender und thrombolytischer Faktoren, die parallel zur Gerinnungskaskade aktiviert werden, sichergestellt. Allgemein handelt es sich bei diesen anti-thrombotischen Faktoren um Proteasen, die durch Spaltung der Gerinnungsfaktoren diese inaktivieren.

[0007] Einer der wichtigsten anti-thrombotischen Faktoren ist Protein C. Nach seiner Aktivierung ist Protein C, zusammen mit seinem Kofaktor Protein S, für die Proteolyse der Gerinnungsfaktoren FV, FVa, FVIII und FVIIIa verantwortlich (5-13).

[0008] Als Risiken für die Entstehung einer tiefen Venenthrombose gelten frische chirurgische Eingriffe, Krebs, Schwangerschaft, Übergewicht, langdauernde Immobilisierung der unteren Gliedmaßen, Rauchen und die Einnahme oraler Kontrazeptiva. In den letzten Jahren sind außerdem eine Reihe genetischer Merkmale identifiziert worden, die mit einer Zunahme des Thromboserisikos assoziiert sind:

Factor V^{Leiden}

[0009] Neben seltenen erblichen Defekten von Protein C und Protein S, die bereits in utero zu schweren Komplikationen in Folge von Thrombosen führen, stellt eine einzige Mutation im Faktor V-Gen eine der wichtigsten Ursachen für ein erhöhtes Thromboserisiko in der Gesamtbevölkerung dar. Bei dieser Mutation handelt es sich um einen Austausch von Guanosin durch Adenosin an Nukleotid 1691 des Genes (G1691A), der zu einer Substitution von Arginin durch Glutamin im Kodon 506 des Faktor V-Proteins führt (14-18).

[0010] Diese Arg⁵⁰⁶→Gln (R506Q)-Variante, die nach der niederländischen Stadt, in der sie entdeckt wurde, Faktor V^{Leiden} genannt wird, kommt überraschend häufig vor und stellt die häufigste Ursache für eine tiefe Venenthrombose dar. In den meisten Bevölkerungen beträgt die Allelfrequenz mindestens 0,5%, in Deutschland liegt sie bei ungefähr 1,5%. Dies bedeutet, daß ungefähr 3% der deutschen Bevölkerung heterozygote Träger der Faktor V^{Leiden} Mutation sind. Träger des Faktor-V-Protein die Leiden-Mutation, so wird es gegenüber der proteolytischen Aktivität von aktiviertem Protein C resistent (sogenannte APC-Resistenz). Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Aktivierung der Gerinnungskaskade und somit zu einer erhöhten Thromboseneigung. Mehr als 95% aller Fälle von APC-Resistenz sind auf die FV^{Leiden}-Mutation zurückzuführen.

[0011] Neben dem genetischen Nachweis der FV^{Leiden}, Mutation, kann die APC-Resistenz auch mittels biochemischer Methoden festgestellt werden. Der genetische Test hat jedoch den Vorteil, daß er zwischen homozygoten und heterozygoten Trägern unterscheiden kann. Diese Unterschied ist wichtig: während Heterozygote ohne andere Risikofaktoren im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 5–10-fach erhöhtes Thromboserisiko aufweisen, steigt das Risiko bei Homozygoten um das 50–100-fache an. Außerdem wird der genetische Test durch Faktoren, die die biochemische Untersuchung stören können, nicht beeinflusst. Zu solchen Faktoren zählen eine Behandlung mit gerinnungshemmenden Mitteln, die Einnahme von oralen Empfängnisverhütungsmittel oder die Hormonersatztherapie. Falls weitere Risikofaktoren wie oben erwähnt vorliegen, kommt es sowohl bei heterozygoten als auch bei homozygoten Trägern der Faktor V^{Leiden}-Mutation zu einer zusätzlichen Steigerung des Thromboembolie-Risikos (19).

Faktor V^{Cambridge}

[0012] Kürzlich wurden weitere Mutationen des Faktor V-Proteins, die mit einer Venenthrombose assoziiert sind, beschrieben.

[0013] Eine dieser Mutationen wurde zum ersten Mal im Addenbrooke's Hospital an der Universität von Cambridge in England beschrieben und wird daher Faktor V^{Cambridge} genannt. Bei der Faktor V^{Cambridge}-Mutation handelt es sich um eine Transversion von Guanosin zu Cytosin an der zweiten Base von Kodon 306 (G1091C), die zu einer Substitution von Threonin durch Arginin an dieser Position führt (R306T). Auch diese Mutation verändert eine Stelle im Faktor V-Protein, die durch aktiviertes Protein C gespalten wird. Obwohl die genaue Prävalenz von Faktor V^{Cambridge} unbekannt ist, ist diese Mutation wahrscheinlich sehr selten. So wurde beispielsweise in der ersten Studie, die diese Veränderung beschrieb, die Mutation in einer Gruppe von 226 Blutspendern nicht gefunden (20). Faktor V^{Cambridge} scheint einen ähnlichen Phänotyp wie Faktor V^{Leiden} aufzuweisen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Faktor V^{Cambridge}-Mutation mit anderen Risikofaktoren in gleicher Weise wie Faktor V^{Leiden} interagiert.

[0014] G20210A Mutation im Prothrombin (Faktor II)-Gen Nach Faktor V^{Leiden} stellt eine G zu A Transition an Nukleotidposition 20210 im nicht-translatierten 3'-Bereich des Prothrombin (Faktor II)-Gens die wichtigste Mutation dar, die eine erbliche Neigung zur Thrombophilie und tiefen Venenthrombose verursacht (21). Vermutlich führt diese Mutation im Gen-Promoter dazu, daß die Konzentration des Prothrombins im Blut um circa 15% ansteigt. Zwischen 1% und 3% der europäischen Bevölkerung sind Träger der Faktor II^{G20210A}-Mutation. Es wird angenommen, daß solche Träger ein etwa dreifach erhöhtes Risiko für tiefe Venenthrombose aufweisen. Wie bei anderen gerinnungsfördernden Mutationen führt die Kombination von Faktor II^{G20210A} mit anderen Risikofaktoren zu einer erheblichen Zunahme des Thromboserisikos. Beispielsweise wird angenommen, daß das Risiko für Frauen mit Faktor II^{G20210A}, die orale Kontrazeptiva nehmen, im Vergleich zur normalen Bevölkerung um mehr als das 100-fache erhöht ist (22, 23).

[0015] Ungefähr 30% der Patienten mit tiefen Venenthrombosen, die Träger von Faktor V^{Leiden} sind, sind außerdem heterozygot für die Mutation G20210A in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombin-Gens. Eine kombinierte Trägerschaft für Faktor V^{Leiden} und Faktor III^{G20210A} ist wahrscheinlich mit einer sehr großen Zunahme des Thromboserisikos assoziiert (22, 24–26). Im Gegensatz zu Faktor V^{Leiden} scheint Faktor III^{G20210A} außerdem mit einem ungefähr 4–6-fach erhöhten Risiko für Herzinfarkt assoziiert zu sein (27, 28). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Faktor III^{G20210A} und Faktor V^{Leiden} ist, daß es keinen biochemischen Test für die Prothrombin-Mutation gibt, weswegen der Nachweis nur auf genetischem Wege möglich ist (29).

4G/5G-Polymorphismus im Promoter des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Gens

[0016] Plasmin ist ein Enzym, das Fibrin spaltet und auf diese Weise Blutgerinnsel auflöst. Plasmin wird durch Aktivierung des Proenzymes Plasminogen gebildet. Diese Aktivierung kann mittels des Enzyms Urokinase (u-PA), das überwiegend in der Niere zu finden ist, erfolgen. Häufiger jedoch ist die Aktivierung durch Gewebeplasminogenaktivator (t-PA), der in großen Mengen in den Endothelzellen der Blutgefäßwand vorliegt. t-PA zeigt eine hohe Bindungsaffinität zum Fibrin. Nach dieser Bindung kommt es zu einer deutlichen Steigerung der t-PA-Aktivität (30). Die Plasminogenaktivatoren werden wiederum durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (PAI-1), einem Serinproteaseinhibitor (Serpine), der hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, inhibiert (31, 32). Im Jahre 1993 wurde im Promoter des PAI-1-Gens ein häufiger Polymorphismus entdeckt (33). Dieser Polymorphismus, die Insertion/Deletion einer einzelnen Base 675 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstart, führt zum Auftreten von 4 oder 5 Guanosinresten in diesem Bereich. Das 4G-Allel hat eine Häufigkeit von circa 40%, das 5G-Allel von circa 60% in der Gesamtbevölkerung (33). Träger des 4G-Alles weisen einen höheren PAI-1-Spiegel auf. Die vermutliche Ursache hierfür ist, daß ein Transkriptionsrepressor, der an das 5G-Allel bindet, nicht an das 4G-Allel binden kann, was zu einer erhöhten Promoteraktivität bei 4G-Trägern führt (33, 34).

[0017] Das Auftreten des 4G-Alles von PAI-1 ist mit einer leichten Zunahme des Herzinfarktrisikos assoziiert

(35). Für lange Zeit herrschte jedoch Uneinigkeit darüber, ob das 4G-Allel mit einem erhöhten Risiko für venöse Thromboembolien in Zusammenhang steht: einige Studien zeigten ein erhöhtes Thromboserisiko (36), andere nicht (37–39). Neuere Studien haben Licht in diese Kontroverse gebracht. Bei Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose fanden Segui und Kollegen keine Anhäufung des 4G-Allels im Vergleich zu normalen Kontrollen. Bei Patienten mit anderen vererbten thrombophilischen Defekten, insbesondere Faktor V^{Leiden} und Prothrombin G^{20210A} , führte jedoch das zusätzliche Auftreten des 4G-Allels zu einer Steigerung des Thromboserisikos: so war die Kombination von 4G mit anderem genetischen Defekt bei Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose achtmal häufiger als in normalen Kontrollen (40). Das 4G-Allel ist also eindeutig ein Faktor, der eine bereits vorliegende Prädisposition zur Thrombose deutlich verschärft. Das Vorliegen anderer nicht genetischer Thromboserisikofaktoren, wie Schwangerschaft oder eine kürzliche Operation, vergrößert den Effekt des 4G-Phänotyps von PAI-1 dagegen nicht (40).

Homocysteine-Stoffwechsel und venöse Thrombose

[0018] Die klassische Homocystinurie ist eine seltene erbliche Stoffwechselkrankheit, die auf Defekte in den Enzymen Cystathionin-beta-Synthase (CBS) oder Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) zurückzuführen ist. Das Krankheitsbild wird durch sehr hohe Serum- und Harnspiegel von Methionin und Homocystein charakterisiert. Homocystein ist eine Aminosäure, die nicht in Proteinen vorkommt, aber Bestandteil des Methionin-Stoffwechsels ist. Die wichtigsten klinischen Zeichen der Homocystinurie betreffen die Augen, die Blutgefäße, das Skelett sowie das zentrale Nervensystem. Die Homocystinurie ist mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose und Venenthrombose assoziiert. In den letzten zehn Jahren hat sich jedoch herausgestellt, daß bereits eine geringfügige Erhöhung des Serum-Homocysteinspiegels mit einem erhöhten Risiko für eine Venenthrombose einhergeht (41, 42). Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Geringfügig erhöhte Homocysteinspiegel können durch Gabe von Vitamin B6 (Pyridoxin) und Folsäure behandelt werden. In einigen Fällen kann auch die Gabe von Vitamin B12 (Hydroxycobalamin) notwendig sein (43). MTHFR katalysiert die Umwandlung von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat, dem Methylgruppendonator für die B12-abhängige Remethylierung von Homocystein zu Methionin. Vitamin B6 ist Kofaktor letzterer Reaktion.

C677T und A1298C Polymorphismen im MTHFR-Gen

[0019] Im MTHFR-Gen sind zwei Polymorphismen, die zu einer milden Hyperhomocystämie beitragen können, beschrieben worden. Die C677T-Transition (Alanin-zu-Valin-Austausch an Kodon 222) führt zu einer erhöhten Thermolabilität des Enzyms und zu geringfügiger Reduzierung seiner in vitro Aktivität. Dieser Polymorphismus wurde zuerst von Kang et al. (44) beschrieben und weist eine Allelfrequenz von circa 0,4 auf (45). Personen, die homozygot für die C677T-Mutation sind, weisen leicht erhöhte Homocysteinspiegel auf, besonders dann, wenn ihr Folatspiegel niedrig ist (46). Eine Homozygotie für den C677T-Polymorphismus wurde in manchen (47, 48), aber nicht allen Studien (45, 49, 50) als Risikofaktor für Venenthrombose beschrieben. Kürzlich ist ein weiterer Polymorphismus im MTHFR-Gen entdeckt worden, der mit einer verringerten in vitro Aktivität des Enzyms einhergeht (51, 52). Diese Mutation, eine A-zu-C-Transversion des Nukleotids 1298, führt zu einem Austausch von Alanin durch Glutamin an Kodon 429 und weist eine Allelfrequenz von 0,33 auf. Nach Abwägung der bis jetzt vorliegenden Ergebnisse scheint weder eine Homo- noch eine Heterozygotie für die A1298C-Mutation allein mit einer Erhöhung des Homocysteinspiegels assoziiert zu sein. Eine gemischte Heterozygotie für C677T und A1298C jedoch scheint mit einer Verminderung der MTHFR-Aktivität und mit höheren Homocysteinspiegeln einherzugehen als eine alleinige Heterozygotie für eine der beiden Varianten (51). Da beide mutierten Allele in der Bevölkerung häufig vorkommen, ist eine solche gemischte Heterozygotie keinesfalls selten.

68 Basenpaar-Insertion an Nukleotid 844 des CBS-Gens

[0020] Mutationen im CBS-Gen verursachen klassischerweise eine Homocystinurie. Sebastio und Kollegen identifizierten jedoch 1995 in Neapel eine 68 bp-Insertion im Exon 8 des CBS-Gens bei italienischen Patienten mit einer Hyperhomocystinurie (53). Diese Mutation, die bei circa 8% der europäischen Bevölkerung vorkommt, hat allein nur einen geringfügigen Effekt auf den Homocysteinspiegel. Allerdings kompensiert das Auftreten der 68 bp-Insertion im CBS-Gen die Homocystin-steigernde Wirkung in Personen, die gleichzeitig Träger des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen sind.

A2756G-Polymorphismus im Methionin-Synthase-Gen

[0021] Leclerc und Kollegen klonierten im Jahre 1993 das Gen der humanen Methionin-Synthase, auch Methyltetrahydrofolat-L-Homocystein-S-Methyltransferase (MTR) genannt (54) und identifizierten gleichzeitig ei-

nen Polymorphismus, A2756G, in diesem Gen. Der Polymorphismus führt zu einer Substitution von Glycin durch Aspartat an Kodon 919 und tritt mit einer Allelfrequenz von circa 16% auf. Diese Variante, die mit pathologischen Veränderungen der Koronararterien bei Rauchern in Zusammenhang gebracht wurde (55) und zu einer Abnahme des Kolonkarzinomrisikos führt (56), ist mit einer Zunahme des Homocystinspiegels assoziiert (57). Außerdem scheint der C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen und der A2756G-Polymorphismus im MTR-Gen einen additiven Effekt auf den Homocystinspiegel im Serum zu haben (57).

[0022] Es ist bekannte, insbesondere Risikogruppen – wie Frauen, die orale Kontrazeptiva nehmen, Rauchern, immobilisierten Personen oder Patienten, die sich einer Operation unterziehen – auf das Vorhandensein von genetischen Defekten, die mit Thrombose assoziiert sind, zu untersuchen.

[0023] In dem Patent EP 0 696 325 B1 ist beispielsweise ein Test zur Untersuchung des Faktors V^{Leiden} beschrieben, der mit einer Thrombose und/oder einer geringen antikoagulierenden Reaktion auf aktiviertes Protein C assoziiert ist (58).

[0024] Augenblicklich erfordert die Suche nach solchen Veränderungen die Amplifikation des polymorphen Abschnitts der genomischen DNA, üblicherweise unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR). Dieser Amplifikation folgt die Detektion des Polymorphismus. Diese basiert auf einer Fragmentanalyse mit Hilfe der Gelektrophorese und schließt gegebenenfalls eine vorgeschaltete Spaltung mit Restriktionsenzymen ein (für eine allgemeine Beschreibung dieser Technik vgl. (59)). Alternativ kann der Polymorphismus mit Hilfe einer spezifischen Hybridisierung markierter Sonden mit der amplifizierten DNA identifiziert werden. Jedes DNA-Fragment kann durch eine separate PCR-Reaktion isoliert werden oder alle Fragmente werden gemeinsam in einer einzigen Multiplex-PCR-Reaktion amplifiziert, wie es Ulvik und Ueland für die simultane Amplifikation von Einzelnukleotid-Polymorphismen beschrieben haben, die den Homocystein-Stoffwechsel betreffen (60). Andere Methoden zur Amplifikation sind die Ligandenkettenreaktion. Die Detektion kann außerdem mit Hilfe verzweigtkettiger DANN (branched DNA), mit Mikropartikel oder basierend auf der Fähigkeit des amplifizierten Produkts zur Ausbildung stabiler verzweigter Strukturen erfolgen, wie in der Patentanmeldung WO 99/36574 beschrieben (61).

[0025] Wie bereits ausgeführt, sind die üblichen Methoden zur Untersuchung einer genetischen Veranlagung für ein erhöhtes Thromboserisiko derzeit darauf beschränkt, den positiven oder negativen Nachweis jedes einzelnen allelen Polymorphismus zu führen. Da das genetische Gesamtrisiko allerdings von der Koexistenz verschiedener allelen Polymorphismen abhängt, stellen diese Methoden kein geeignetes Werkzeug dar, um das genetische Risiko einer Thrombose in seiner Vollständigkeit aussagekräftig beurteilen zu können. Beispiele für diese synergistische Wirkung verschiedener, die Ausbildung einer Thrombose begünstigender genetischer Faktoren sind das 4G-Allel des PAI-1-Gens (das Auftreten des 4G-Alles zusammen mit Faktor V^{Leiden} oder Prothrombin^{G20210A}, war in Patienten mit tiefer Venenthrombose achtmal höher als in Kontrollpersonen) oder die Interaktion von Faktor V^{Leiden} mit Prothrombin^{G20210A} (siehe oben).

[0026] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Mittel und eine Methode zur Bestimmung der genetischen Veranlagung zu einem erhöhten Thromboserisiko bereitzustellen, wobei die synergistischen Effekte möglicher koexistierender alleler Varianten erfaßt werden können, die aber jeweils auch für sich allein zu einem erhöhten Thromboserisiko beitragen. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Set molekulabiologischer Materialien bereitzustellen, die die Durchführung der in der Erfindung beschriebenen Methode ermöglichen.

[0027] Im Kern basiert sie vorliegende Erfindung darauf, das Thromboserisiko mit Hilfe eines Verfahrens zu bestimmen, das die Bestimmung mindestens zweier alleler Varianten ermöglicht, die relevant für die genetische Thrombose-Prädisposition sind. Die Untersuchungsergebnisse werden ausschließlich multifaktoriell ausgewertet.

[0028] Das erfindungsgemäße Verfahren – d.h. die simultane Untersuchung mindestens zweier wichtiger Polymorphismen, die die Entstehung einer Thrombophilie beeinflussen, in nur einem Testkit – macht die Anwendung einer Vielzahl der bisher bekannten Testsysteme überflüssig, die jedes nur ein einziges dieser Allele erfassen konnten. Damit liefert die, erfindungsgemäße Methode nicht nur ein sinnvolles System zur Risikoabschätzung, sondern ermöglicht außerdem eine Kosten- und Zeitsparnis.

[0029] Den spezifische Vorteil der erfindungsgemäßen Methode veranschaulicht folgendes Beispiel: Faktor V^{Leiden} hat eine Allelfrequenz von 1,5%. Die Allelfrequenz der Faktor II^{G20210A}-Mutation liegt zwischen 1 und 3%. Unter der begründeten Annahme, dass zwischen diesen Allelen keine Kopplung vorliegt, ist anzunehmen, dass 1 bis 3 von 2000 Personen in der europäischen Bevölkerung Träger beider Allele sind. Das Auftreten von Kombinationen aus den Polymorphismen, die die Gene des Homocysteinstoffwechsels betreffen, ist sehr viel wahrscheinlicher, berücksichtigt man die oben beschriebenen relativ hohen Allelfrequenz dieser Polymorphismen in der europäischen Bevölkerung. Beispielsweise hat der C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen eine Allelfrequenz von 0,40 der A2756G-Polymorphismus im MTR-Gen weist einen Wert von 0,16 auf. Dies lässt unter der Annahme, das keinerlei Kopplung beider Gene vorliegt, erwarten, daß beide Allele mit einer Wahrscheinlichkeit von 16% zusammen auftreten. Dehnt man diese Betrachtung auf mehrere Faktoren aus, ist bei einer dreifachen Kombination aus C677T-Polymorphismus bei MTHFR, A2756G bei MTR und Faktor V^{Leiden} mit

einer Auftretenswahrscheinlichkeit von 5 unter 1000 Personen in der Gesamtbevölkerung zu rechnen. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist eine einfache Untersuchung dieser Patienten möglich.

[0030] Das parallele und gleichzeitige Screenen wichtiger Thrombophilie-relevanter Polymorphismen auf nur einem Array bietet die Möglichkeit, klinisch bedeutsame und bis heute unbekannte Wechselwirkungen zwischen diesen Allelen in der Gesamtbevölkerung und insbesondere in Patienten mit erhöhtem Risiko einer tiefen Venenthrombose aufzudecken.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden gleichzeitig alle genannten Polymorphismen mit Hilfe der DNA-Array-Technologie (wie in Beispiel 1 beschrieben, siehe unten) untersucht. In alternativen Ausführungsformen sind allerdings auch eine Vielzahl anderer Methoden anwendbar. Diese umfassen beispielsweise folgende Techniken:

1. Arrays auf Latex- oder anderen geeigneten Partikeln (sogenannten "soluble arrays" (62))
2. Methoden, basierend auf einer Polymerasekettenreaktion
 - a. Multiplex-Polymerasekettenreaktion kombiniert mit allelpezifischer Hybridisierung auf Nylonfiltern (63).
 - b. Multiplex-Polymerasekettenreaktion kombiniert mit allelpezifischer Hybridisierung in Multiwell-Platten oder -Streifen (z.B. Roche Diagnostics AG).
 - c. Real-time Multiplex-Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Fluoreszenz-Markern (z.B. light cycler (64), Roche Diagnostics AG) oder anderen Markierungen.
3. Eine Multiplex-Version der Ligasekettenreaktion (65).
4. Methoden, basierend auf einer DNA-Sequenzierung
 - a. Konventionelle DNA-Sequenzierung unter Verwendung der Sanger dideoxy-Kettenabbruch-Reaktion (66).
 - b. DNA-Sequenzierung mittels Matrix-unterstützter Laser Desorptions-/Ionisierungs-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) (z.B. Sequenom technology (67)).

[0032] Eine Vielzahl von Methoden kann herangezogen werden, um ein Zielmolekül auf einem Array oder einem anderen Substrat detektierbar zu machen. Dies schließt auch Methoden ein, die keine Markierung des Zielmoleküls erfordern, wie beispielsweise die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie (68), eine direkte elektrische Messung (US-Patent: US 5,605,662); Oberflächenwellen-Sensoren (surface acoustic wave (SAW) sensors (69)), "Crystal-Microbalance-Dissipation" und verschiedene interferometrische Methoden sowie die reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (70).

[0033] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Markierung und Detektion der Zielmoleküle mittels Fluoreszenz und Gold/Silberfärbung (siehe Beispiel 1 unten). Neben einer einfachen Fluoreszenzmarkierung können auch fluoreszenzmarkierte DNA-Dendrimere genutzt werden, um die Sensitivität zu erhöhen (71). Ein weitere Alternative ist die Verwendung von Massenmarkierungen, die mittels Massenspektrometrie detektiert werden können (72). Anorganische Fluoreszenzmarkierungen, die nicht wie organische Farbstoffe die Eigenschaft des Ausbleichens haben, können ebenfalls verwendet werden, wie up-converting phosphor (73) und quantum dots (74). Außerdem können Chemilumineszenz und Biolumineszenz für die Markierung und Detektion zum Einsatz kommen. Diese Systeme basieren beispielsweise auf der durch Peroxidase aus Meerrettich katalysierten Umwandlung von Luminol und Wasserstoffperoxid zu einer chemiluminiszierenden Substanz oder auf der Verwendung von kommerziellen 1,2-Dioxetan-basierten Substraten wie CDP-Star®, AMPPD®, oder CSPD®.

[0034] Ebenso sind indirekte Markierungsverfahren für die Detektion eines Zielmoleküls möglich. Diese schließt das Biotin/Streptavidin-Kopplungssystem ein sowie Kopplungssysteme, die auf gekoppelten Enzymen oder gekoppelten Antikörpern basieren, die gegen kleine Moleküle wie Digoxigenin oder Fluorescein-Isothiocyanat gerichtet sind, die an die Ziel-DNA gekoppelt vorliegen.

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft zudem molekularbiologische Mittel zur Bestimmung genetischer Polymorphismen, die mit dem genetischen Risiko einer Thrombole korrelieren. Diese können in einem diagnostischen Kit zusammengefaßt sein.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Oligonukleotidprimer unter Reaktionsbedingungen eingesetzt, die die gleichzeitige Amplifikation der folgenden genetischen Polymorphismen ermöglichen: Faktor V^{Leiden}, Faktor V^{Cambridge}, die G20210A-Mutation im Prothrombin (Faktor II)-Gen, den 4G/5G-Polymorphismus im Promoter des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Gens, der C677T- und A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen, die 68 bp-Insertion an Nukleotid 844 im CBS-Gen und der A2756G-Polymorphismus im Methionin-Synthase-Gen (Tabelle 1).

[0037] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können Wildtyp- und mutanten Allele gleichzeitig und selektiv durch Hybridisierung auf einem DNA-Array nachgewiesen werden. Ein weiterer Aspekt betrifft die Detektion der Wildtyp- und mutanten Allele auf der Basis von Fluoreszenz oder Silberfärbung, was entweder durch die direkte Markierung der Oligonukleotidproben oder durch indirekte Markierung, beispielsweise durch das Biotin/Streptavidin-Kopplungssystem ermöglicht werden kann.

Definitionen

[0038] Im Rahmen dieser Erfindung umfasst der Begriff "Nukleinsäure" sowohl RNA als auch DNA (einschließlich deren Derivate), einschließlich cDNA, genomicscher DNA und chemisch synthetisierte DNA genau so wie rekombinante, isolierte oder anderweitig modifizierte Nukleinsäuren (einschließlich chimärer Nukleinundusäuren). Die Nukleinsäure kann einsträngig oder doppelsträngig sein. Wenn einzelsträngig, kann es sich bei der Nukleinsäure um den kodierenden oder den nicht-kodierenden Strang handeln. Außerdem kann die Nukleinsäure zirkulär oder linear sein.

[0039] Allgemein bezieht sich die PCR auf eine Methode oder Technik, in der die Zielnukleinsäure in zyklischen Polymerasereaktionen amplifiziert wird, wie es im US Patent 4,683,195 beschrieben wird. Diese Technik schließt ebenfalls Modifikationen ein, die auf der dort beschriebenen Methode aufbauen.

[0040] Der Begriff "Primer" bezieht sich auf Nukleinsäuren, die mit DNA hybridisieren und dabei ein freies 3'-Ende als Startpunkt für die Polymeraseaktivität bereitstellen.

[0041] Der Begriff "Polymorphismus" bezieht sich auf die Existenz verschiedener Allel eines Genes innerhalb einer Population. Diese Polymorphismen können – in heterozygotem oder homozygotem Status – Veränderungen im Phänotyp hervorrufen.

Beispiel 1:

Erfindungsgemäße Detektion genetischer Polymorphismen, die das Risiko einer Thromboembolie betreffen, mit Hilfe der DNA-Array-Technologie

Ausführungsbeispiel 1:

Gleichzeitige Detektion mittels Array-Tube-Technologie

[0042] In diesem Beispiel wird die Detektion relevanter Mutationen auf Basis der DNA-Array-Technologie durchgeführt, insbesondere unter Verwendung des Reaktionsgefäßes, des in der deutschen Patentanmeldung 102 01 463.9, "Reaktionsgefäß zur Durchführung von Array-Verfahren", (ClonDiag Chip Technologies GmbH) vom 16. Januar 2002. Die Technik zur Detektion der Interaktion der Proben mit dem Array ist Gegenstand der internationalen Patentanmeldung PCT/EP 01/07575 "Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von molekularen Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays", (ClonDiag Chip Technologies GmbH) vom 2. Juli 2001.

[0043] Die untersuchten Allele sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Allele für den Thrombophilie-Chip

Position auf dem Array	Nukleotid			Aminosäure		Beschreibung	
	Wildtyp	Position	Mutante	Wildtyp	Kodon		
1	G	1691	A	Arg	506	Gln	Faktor V ^{Leiden}
2	G	1091	C	Arg	306	Thr	Faktor V ^{Cambridge}
3	G	20210	A				Faktor II (Prothrombin) Promoter
4	C	677	T	Ala	222	Val	Thermolabile Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
5	A	1298	C	Glu	428	Ala	Thermolabile MethylenTetrahydrofolat-Reduktase
6		844	ins 68 bp				Cystathionin-beta-Synthase
7	4G	Promoter	5G				Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
8	A	2756	G	Asp	919	Gly	Methionin-Synthase

MATERIAL UND METHODEN

A. Liste der verwendeten Puffer

[0044] Die Tabelle 2 führt die verwendeten Puffer auf.

Tabelle 2: Puffer

Puffer	Zusammensetzung
6 x SSPE/ 0,1% SDS-Puffer	900 mM Natriumchlorid, 60 mM Natriumdihydrogenphosphat, 6 mM Ethylendiamintetraacetat, 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, pH 7.4
3DNA-Puffer	0.25 M Natriumphosphat, 1x Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer (SSC), 4.5% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 7.2
2 x MES (2-(N-morpholino) ethan sulfonsäure)	200 mM MES, 1.8 M NaCl, 40 mM EDTA, 0.1 % (w/v) Cetyl-dimethylethylammoniumbromid, pH 6.8
Waschlösung 1	2 x SSC, 0.1% SDS
Waschlösung 2	2 x SSC
Waschlösung 3	0.2 x SSC

B. Multiplex-PCR-Reaktion

a. Primer

[0045] Um die Gensequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Allele zu amplifizieren, wurde eine Multiplex-PCR-Reaktion für die gleichzeitige Amplifizierung von acht Sequenzen humaner DNA entwickelt. Die verwendeten Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 3 aufgelistet.

[0046] Primer, die mit einem "s" bezeichnet sind, tragen an ihrem 5'-Ende entweder ein Biotinmolekül oder eine Cyanin 3.18-(Cy3) Fluoreszenzmarkierung. Die Qualifizierung mit "s" bedeutet dabei, daß es sich um Primer handelt, die komplementär zum Sence-Strang sind; während "as" auf die Komplementarität zum Anti-Sence-Strang hinweist.

Tabelle 3: Primer für die Amplifizierung der Allele aus Tabelle 1 (und einem zusätzlichen Kontroll-Amplikon "H1F3") mittels Multiplex-PCR-Reaktion

Gen	Name	Sequenz 5'-3'	Größe des amplifizierten Produkts [bp]	Seq. ID-No.
Faktor V	FakV-1691-s	agaaaatgtgccaggcttaac	214	1
Faktor V	FakV-1691-as	ccattatttagccaggagacctaac		2
Faktor V	FakV-R306T-s	tgggatgcaggcttacattg	190	3
Faktor V	FakV-R306T-as	aglgtatgaaccccaacaactc		4
Faktor II	FakII-20210-s	acagaaggtcattgtcatcgatgg	228	5
Faktor II	FakII-20210-as	accagggtggattcttaagtc		6
MTHFR	MTHFR-677-s	ctctcctgactgtcatccctattg	225	7
MTHFR	MTHFR-677-as	cacctggatggaaagatcc		8
oder				
MTHFR	MTHFR-677-s	ctctcctgactgtcatccctattg		7
MTHFR	MTHFR-677-as2	acgatggggcaagtgtatg	200	9
oder				
MTHFR	MTHFR-677-s	ctctcctgactgtcatccctattg		7
MTHFR	MTHFR-677-as3	gtgcatgcctcacaaagc	174	10
MTHFR	MTHFR-1298-s	tggggagctgaaggactactacc	253	11
MTHFR	MTHFR-1298-as	caggatgggaagtcacagc		12
CBS	CBS-844-s	aatagaataatcgaggcatgtccag	207/275	13
CBS	CBS-844-as	actcgacacctaccgtcctgtcc		14
oder				

CBS	CBS-844-s	aatagaatatcgaggcatgtccag	186	13
CBS	CBS-844-as2	agcacccgtggggatgaag		15
oder				
CBS	CBS-844-s	aatagaatatcgaggcatgtccag	181	13
CBS	CBS-844-as3	cgtggggatgaagtctgtac		16
oder				
CBS	CBS-844-s	aatagaatatcgaggcatgtccag		13
CBS	CBS-844-as4	gttgtctgctccgtctggtc	141	17
PAI1	PAI1-5'UTR-s	cagcacaccccaacctcag	196	18
PAI1	PAI1-5'UTR-as	ccacgtgattgtctaggtttgtc		19
MTR	MTR-D919G-s	ctacaccagttttatcatctttgctc	182	20
MTR	MTR-D919G-as	aacaagcaaaaatctgttctaccac		21
H1F3	H1F3-s	tggctccttcaaactcaacaag	318	22
H1F3	H1F3-as	ttcggcttccccgacttag		23

b. Reaktionsmix für die Polymerasekettenreaktion

[0047] Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die Polymerasekettenreaktion ist in Tabelle 4 wieder-gegeben.

[0048] Tabelle 4: Reaktionsmix für 50 µl-PCR-Reaktionen. Die Angaben in Klammern geben die gesamte mögliche Breite des genannten Parameters an. Die Ansätze unter a) oder b) stellen Alternativen dar.

a	Jeder PCR-Primer	400 nM (100 – 800 nM)
	humane genomische DNA	100 ng (20 – 250 ng)
	dNTPs (jedes)	250 µM (Amersham Biociences, Freiburg, Deutschland) (200 – 500 µM)
	HotStar-Taq DNA Polymerase	5 U (Qiagen, Hilden, Deutschland)
		(2.5 – 10 U)
	10× buffer	5 µL (Qiagen)
oder		
b	Jeder PCR-Primer	800 nM (100 – 1200 nM)
	humane genomische DNA	100 ng (20 – 250 ng)
	dNTPs (jedes)	200 µM (Amersham Biociences) (200 – 500 µM)
	AccuPrime-Taq DNA Polymerase	10 U (Invitrogen, Paisley, GB) (2.5 – 20 U)
	10× Puffer	5 µL (Invitrogen)

[0049] Die Multiplex-PCR-Reaktionen nach a) oder b) werden nach dem folgenden Protokoll in einem Per-

kin-Elmer 9600 Thermocycler (PE Biosystems, Langen, Deutschland) durchgeführt: Denaturierung, ein Zyklus bei 95°C (92 bis 95°C) für 15 min (1–15 min); Amplifizierung in 35 Zyklen (20–45 Zyklen) mit Denaturierung bei 94°C (92–95°C) für 1 min, Annealing bei 56°C (52 bis 62°C) für 2 min (2–4 min) und Verlängerung bei 68°C (66–72°C) für 1 min (0–10 min); anschließende Verlängerung, ein Zyklus bei 68°C (60–72°C) für 5 min (5–30 min). Die relative Ausbeute und die Größe der einzelnen Fragmente wird mittels Kapillarelektrophorese in einem ABI Prism 310C oder einem ABI Prism 3100 Avant DNA-Sequenziergerät (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) bestimmt. Alternativ zu den Multiplex-PCR-Methoden a) und b) wurde das Multiplex PCR-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), in Verbindung mit jeweils 100 bis 1200 nM PCR-Primer und 20 bis 250 ng humarer, genomicscher DNA und den im vorhergehenden Absatz beschriebenen Amplifikations-schritten verwendet.

c. Herstellung von DNA Test-Arrays in Array-Tubes

[0050] Die PCR-Produkte werden mit immobilisierten DNA-Proben in Reaktionsgefäß en (Array-Tubes) hybridiert, wie in der deutschen Patentanmeldung 102 01 463.9, "Reaktionsgefäß zur Durchführung von Array-Verfahren" beschrieben (siehe oben). Die Technik zur Detektion der Interaktion der PCR-Produkte mit dem Array ist Gegenstand der internationalen Patentanmeldung PCT/EP 01/07575 "Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von molekularen Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays" (siehe oben). Die Sonden auf dem Array bestehen aus synthetischer einzelsträngiger DNA mit kovalent gebundenem Aminolink am 5'-Ende (MWG Biotech). Alle verwendeten Sonden sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

[0051] Die Sonden wurden so ausgesucht, daß sie entweder die Wildtypsequenz oder die an der Position des Polymorphismus entsprechend veränderte Sequenz repräsentieren. Die Sonden werden auf das Array aufgebracht, indem entweder herkömmliche Spotting-Verfahren mit einem MicroGrid II Microarray Spotter (Biorobotics Ltd., Cambridge, GB) auf Glasobjekträgern mit Epoxy-modifizierter Oberfläche verwendet werden oder eine in situ-Synthese durchgeführt wird, wie sie auf Seite 61 der deutschen Patentanmeldung 102 01 463.9 (siehe oben). Die Sonden werden in einer Lösung aus 0,1 M Na₃PO₄, 2,2 % Na₂SO₄, pH 9,0 aufgebracht. Danach werden die Amino-modifizierten Sonden durch 30-minütiges Backen bei 60°C kovalent an die Epoxygruppen der Objekträgeroberfläche gebunden.

[0052] Die Mittelpunkte benachbarter Spots haben einen Abstand von 200 µm, die gesamte Fläche eines Arrays beträgt 2,4 × 2,4 mm. Auf diese Weise können mehr als 100 identische Arrays auf einem einzigen Objekträger der Größe 75 × 25 mm erstellt werden. Ein einzelnes Array besteht dabei aus 12 × 10 = 120 Spotposi-tionen.

[0053] Die Spots der äußersten Reihe auf jeder Seite des Arrays werden für Kontrollen der Silberfärbung ge-nutzt, so daß 100 Spots übrigbleiben, die folgendermaßen genutzt werden:

1. Zur Alleldetektion; wie oben beschrieben. (Um die Effizienz der Hybridisierungsreaktion zu überwachen, wird jede Sonde doppelt oder dreifach gespottet).
2. Zur Kontrolle der PCR-Effizienz (Jede Sonde wird üblicherweise doppelt gespottet).
3. Zur Kontrolle der Hybridisierungstemperatur.

D. Kontrollspots für die DNA-Test-Arrays in Array-Tubes

[0054] Zusätzlich zu den Sonden, die zur Detektion der genetischen Varianten genutzt werden, weist das Ar-ray Kontrollspots auf, die zur Qualitätskontrolle des Spotting und als Markierungen für die Orientierung des Ar-arrays bei der Auswertung dienen. Im einzelnen enthält der Array folgende vier Typen von Kontrollspots:

a. Kontrolle der Silberfärbung

[0055] Zwei verschiedene Oligonukleotide (Bio-P1 cctctgcagactactattac und Bio-P1' gtaatagttagtctgcagagg), die eine 5'-Aminomodifizierung und eine 3'-Biotinmarkierung aufweisen, werden in äquimolarem Verhältnis ge-mischt und an sieben Positionen in den beiden äußersten Reihen des Arrays gespottet. Diese Sonden dienen als Kontrolle für die Silberfärbungsreaktion. Außerdem werden diese Spots genutzt, um das Array bei der Aus-wertung im Array-Lesegerät korrekt auszurichten.

b. Kontrolle der Effizienz der Polymerasekettenreaktion

[0056] Mit Hilfe amplikonspezifischer Sonden wird überprüft, ob ausreichende Mengen der acht PCR-Produk-te gebildet werden. Die Sequenzen dieser Sonden unterscheiden sich von denjenigen, die zur Detektion der Polymorphismen eingesetzt werden und enthalten keine bekannten Mutationen. Die verwendeten Oligonukle-otide wurden so ausgesucht, daß ihre theoretische Schmelztemperatur 5 bis 8°C über derjenigen der Sonden liegt, die zur Detektion der Polymorphismen eingesetzt werden. Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 6 auf-

geführt.

c. Kontrolle der Arrayqualität

[0057] Der Spottingpuffer wird wie oben beschrieben zusammengesetzt. Er erlaubt eine Visualisierung der Spots vor der Hybridisierung. Dies ermöglicht es, die Qualität und Morphologie der Spots jedes Arrays im Array-Lesegerät vor der Hybridisierung zu beurteilen. Nicht gewaschene Array-Tubes werden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Nach bis zu dreimonatiger Lagerung ist keine detektierbare Verringerung der Hybridisierungssignale festzustellen und die Array-Tubes können direkt ohne weitere Behandlung verwendet werden.

d. Kontrolle der Hybridisierungsbedingungen

[0058] Die Verwendung der geeigneten Hybridisierungstemperatur wird ermittelt, indem zwei der Sonden verwendet werden, die in Tabelle 7 aufgeführt sind.

[0059] Wenn die Hybridisierungstemperatur zu niedrig war, geben beide Sonden ein Hybridisierungssignal, war die Temperatur zu hoch, reagiert keine der beiden positiv. Die gewünschte Hybridisierungstemperatur gibt nur ein Signal und zwar bei dem Spot, der die längere Sonde enthält. Ein zusätzliches PCR-Produkt, das eine Sequenz des hochkonservierten Histons H1F3 enthält, dient als Probe für diese Sonden. Die korrespondierenden PCR-Primer (H1F3-s tggctcctcaaactcaacaag and H1F3-as tcggcttcccgacttag) werden in die Multiplex-PCR-Reaktion integriert. Das resultierende PCR-Produkt besteht aus 318 bp.

Tabelle 5: DNA-Sonden für den Thrombophilie-Chip im Array-Tube-Format

[0060] Die Abkürzung "pm" gibt an, daß es sich bei der jeweiligen Sonde um einen "perfect match" mit der Wildtyp-Sequenz handelt, während "mm" auf den "mismatch" mit dem Wildtyp hinweist.

Gen	Name der Sonde	5'-3' Sequenz	Seq.-ID-No.
Faktor V	FakV-1691-pmC	tgtattccctcgcctgtcc	24
	FakV-1691-mmT	tgtattccctgcctgtcc	25
	FakV-1691-mmT	ctgtattccctgcctgtcc	26
	FakV-1691-mmA	tgtattccctagccgtcc	27
	FakV-1691-mmA	ctgtattccctagccgtcc	28
	FakV-1691-mmG	tgtattccctggccgtcc	29
	FAKV-R306-pmC	tcttaagattccctggtttctt	30
	FAKV-R306-mmG	tcttaagattcgtggtttctt	31
	FAKV-R306-mmA	tcttaagattcatggtttctt	32
	FAKV-R306-mmT	tcttaagattctgggtttctt	33
Faktor II	FakII-20210-pmC	attgaggctcgctgagag	34
	FakII-20210-mmT	attgaggcttgctgagag	35
	FakII-20210-mmT	attgaggcttgctgagagt	36
	FakII-20210-mmA	attgaggctagctgagag	37
	FakII-20210-mmA	attgaggctagctgagagt	38
	FakII-20210-mmG	attgaggctggctgagag	39
PAI1	PAI1-insG-4pm	gctgactcc ccacgtgt	40
	PAI1-insG-4pm	ctgactcc ccacgtgtc	41
	PAI1-insG-4pm	ctgactcc ccacgtgt	42
	PAI1-insG-5mmC	ctgactcccccacgtgt	43
	PAI1-insG-mmA	ctgactccaccacgtgt	44
	PAI1-insG-mmA	gctgactccaccacgtgt	45

PAI1-insG-mmT	ctgactcctcacgtgt	46
PAI1-insG-mmT	gctgactcctcacgtgt	47
PAI1-insG-mmG	ctgactccgccacgtgt	48
PAI1-insG-4pm	ggctgactcc ccacgt	49
PAI1-insG-5mmC	gctgactcccccacgt	50
PAI1-insG-mmA	ggctgactccaccacgt	51
PAI1-insG-mmA	gctgactccaccacgt	52
PAI1-insG-mmT	ggctgactcctcacgt	53
PAI1-insG-mmT	gctgactcctcacgt	54
PAI1-insG-mmG	gctgactccgccacgt	55

Tabelle 5 (Fortsetzung): DNA-Sonden für den Thrombophilie-Chip im Array-Tube-Format

MTHFR	MTHFR-677pmG	atgaaatcggtcccg	56
	MTHFR-677pmG	aatcggtcccgcag	57
	MTHFR-677mmA	gatgaaatcgactcccg	58
	MTHFR-677mmA	atgaaatcgactcccg	59
	MTHFR-677mmA	gaaatcgactcccgcag	60
	MTHFR-677mmA	aatcgactcccgcag	61
	MTHFR-677mmT	gatgaaatcgactcccg	62
	MTHFR-677mmT	atgaaatcgactcccg	63
	MTHFR-677mmT	gaaatcgactcccgcag	64
	MTHFR-677mmT	aatcgactcccgcag	65
	MTHFR-677mmC	atgaaatcgactcccg	66
	MTHFR-677mmC	aatcgactcccgcag	67
	MTHFR-1298pmT	aaagacactttcttcactggc	68
	MTHFR-1298pmT	caaagacactttcttcactgg	69
	MTHFR-1298mmG	aaagacacttgcttcactggg	70
	MTHFR-1298mmG	aaagacacttgctactggc	71
	MTHFR-1298mmA	aaagacacttacttcactggc	72

MTHFR-1298mmC	aaagacacttccttcactgg	73
---------------	----------------------	----

CBS	CBSins68pm	acccttcggatccac	74
	CBSins68pm	tccggatccacccc	75
	CBSins68mm	ccccaatgatctgcaga	76
	CBSins68mm	aaaagccccacctgga	77
	CBSins68	cccacctggatgtccac	78
	CBSins68	cccacctggatgtcca	79
	CBSins68	gccccaccctggatgtac	80
	CBSins68	cccaatgatctgcagagg	81
	CBSins68	ccccaatgatctgcagag	82
	CBSins68	caccccaatgatctgcag	83
	CBSins68	cccatgtatctgcagagg	84
	CBSins68	ccccatgtatctgcagag	85
	CBSins68	caccccaatgtatctgcag	86

Tabelle 5 (Fortsetzung): DNA-Sonden für den Thrombophilie-Chip im Array-Tube-Format

MTR	MTR-D919G-pmT	gactcataatggtcctgtctaata	87
	MTR-D919G-pmT	gagactcataatggtcctgtcta	88
	MTR-D919G-pmT	cataatggtcctgtctaataatctt	89
	MTR-D919G-mmC	gactcataatggccctgtctaata	90
	MTR-D919G-mmC	actcataatggccctgtctaata	91
	MTR-D919G-mmC	actcataatggccctgtctaataat	92
	MTR-D919G-mmC	gagactcataatggccctgtcta	93
	MTR-D919G-mmC	agactcataatggccctgtcta	94
	MTR-D919G-mmC	gagactcataatggccctgtct	95
	MTR-D919G-mmA	gactcataatggacctgtctaata	96
	MTR-D919G-mmA	gactcataatggacctgtctaataat	97
	MTR-D919G-mmA	actcataatggacctgtctaataata	98

MTR-D919G-mmA	gagactcataatggacacctgtcta	99
MTR-D919G-mmA	agactcataatggacacctgtcta	100
MTR-D919G-mmA	gagactcataatggacacctgtct	101
MTR-D919G-mmA	cataatggacacctgtctaataatctt	102
MTR-D919G-mmA	ataatggacacctgtctaataatctt	103
MTR-D919G-mmA	cataatggacacctgtctaataatct	104
MTR-D919G-mmG	gactcataatgggcctgtctaata	105
MTR-D919G-mmG	actcataatgggcctgtctaata	106
MTR-D919G-mmG	actcataatgggcctgtctaataat	107
MTR-D919G-mmG	gagactcataatgggcctgtcta	108
MTR-D919G-mmG	agactcataatgggcctgtcta	109
MTR-D919G-mmG	agactcataatgggcctgtct	110
MTR-D919G-mmG	cataatgggcctgtctaataatctt	111
MTR-D919G-mmG	ataatgggcctgtctaataatctt	112
MTR-D919G-mmG	ataatgggcctgtctaataatct	113

Tabelle 6: DNA-Sonden für den Thrombophilie-Chip im Array-Tube-Format; Kontrollen für den Nachweis der PCR-Amplikons. (Die Abkürzung KS bezieht sich auf die "Kontrollfunktion" der jeweiligen Sonde)

Gen	Name der Sonde	5'-3' Sequenz	Seq.-ID-No.
Factor V	FakV-306-KS	acttgtccatattcgctggtattac	114
	FakV-306-KS	gtccccaaatgacttcctctgc	115
	FakV-506-KS	ccagaagaaaattctcagaatttctg	116
	FakV-506-KS	tccacgtcactgttagtatggctt	117
Factor II	FakII-20210-KS	gtattactggcttcctgagcc	118
	FakII-20210-KS	aaataattcttcacgggattgg	119
PAI1	PAI1-insG-KS	aacagaggacttggctttcc	120
	PAI1-insG-KS	ctctctgtgtcaacaaccctgtc	121
MTHFR	MTHFR-677-KS	ttcacaaaagcggaaagaatgtg	122
	MTHFR-677-KS	cttcaggtcagcctcaaagct	123
	MTHFR-1298-KS	gggacttgcttcaggtagaag	124
	MTHFR-1298-KS	ccactccagcatcactcacttt	125
CBS	CBS-KS	accgtggggatgaagtgcgt	126
	CBS-KS	ttgtctgctccgtctggttc	127
	CBS-KS	gcggcttcaggcgtcaag	128
MTR	MTR-919-KS	cctcaaagtattcatcccttagattt	129
	MTR-919-KS	ctaacagctggaaacactgaaaa	130

Tabelle 7: DNA-Sonden für den Thrombophilie-Chip im Array-Tube-Format; Kontrollen für die korrekte Hybridisierungstemperatur.

gen	Name der Sonde	5'-3' Sequenz	Seq.-ID-No.
H1F3	H1F3-a-29	gcataaaaagactcctaagaaggtaaag	131
	H1F3-a-28	gcataaaaagactcctaagaaggtaaa	132
	H1F3-a-27	gcataaaaagactcctaagaaggtaa	133
	H1F3-a-26	gcataaaaagactcctaagaaggta	134
	H1F3-a-25	gcataaaaagactcctaagaaggta	135
	H1F3-a-24	gcataaaaagactcctaagaagg	136
	H1F3-a-23	gcataaaaagactcctaagaag	137
	H1F3-a-22	gcataaaaagactcctaagaa	138
	H1F3-a-21	gcataaaaagactcctaaga	139
	H1F3-a-20	gcataaaaagactcctaag	140
	H1F3-a-19	gcataaaaagactcctaa	141
	H1F3-a-18	gcataaaaagactccta	142
	H1F3-a-17	gcataaaaagactcct	143
	H1F3-a-16	gcataaaaagactcc	144
H1F3-b	H1F3-b-25	ggtggaaaacacccctcagccaaaaaaaa	145
	H1F3-b-24	ggtggaaaacacccctcagccaaaaaaaa	146
	H1F3-b-23	ggtggaaaacacccctcagccaaaaaaaa	147
	H1F3-b-22	ggtggaaaacacccctcagccaaaa	148
	H1F3-b-21	ggtggaaaacacccctcagccaaa	149
	H1F3-b-20	ggtggaaaacacccctcagccaa	150
	H1F3-b-19	ggtggaaaacacccctcagcc	151
	H1F3-b-18	ggtggaaaacacccctcagcc	152
	H1F3-b-17	ggtggaaaacacccctcagc	153
	H1F3-b-16	ggtggaaaacacccctcag	154

E. Hybridisierung von DNA-Arrays in Array-Tubes

[0061] Nachdem die Sonden auf die Objektträgeroberfläche aufgebracht worden sind, werden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei 37°C für 30 min inkubiert. Die PCR-Primer, die verwendet werden, um die Proben für die Hybridisierung auf dem DNA-Array zu generieren, sind an ihrem 5'-Ende kovalent mit Biotin markiert.

[0062] Vor der Hybridisierung des PCR-Reaktionsansatzes im Array-Tube werden 150 µl Hybridisierungslösung hergestellt, indem 5 bis 50 µl des PCR-Reaktionsansatzes mit 145 bis 100 µl des Hybridisierungspuffers (3DNA-Puffer, 2 × MES Puffer oder 6 × SSPE/0,1% SDS-Puffer; Tabelle 2) versetzt und 4 min bei 98°C inkubiert werden. Die Hybridisierungslösung wird in das Array-Tube gegeben und für 90 min bei 30°C und 350 Umdrehungen pro Minute (Upm) in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Hybridisierungslösung wird abgesaugt und 500 µl, auf 55°C vorgewärmter Hybridisierungspuffer (3DNA-Puffer, 2

× MES Puffer oder 6 × SSPE/0,1% SDS-Puffer) zugegeben und bei 55°C und 350 Upm für 10 min inkubiert. Dann wird der Inhalt des Array-Tubes abgesaugt und durch 500 µl Waschlösung 1 ersetzt, mit der das Array-Tube 10 min bei 30°C und 750 Upm inkubiert wird. Das Array-Tube wird wieder leergesaugt und 500 µl Waschlösung 2 zugegeben und 10 min bei 20°C und 750 Upm inkubiert. Wieder wird das Array-Tube leergesaugt und das Array mit 150 µl Blockierungslösung, die aus 2% entfettetem Milchpulver ("Lasana" oder "Magermilchpulver", Applichem, Darmstadt, Deutschland) in Hybridisierungspuffer (3DNA-Puffer, 2 × MES Puffer oder 6 × SSPE/0,1% SDS-Puffer) besteht, für 15 min bei 30°C und 350 Upm inkubiert. Das Array-Tube wird leergesaugt und 150 µl Streptavidin-Gold-Konjugat-Lösung (Goldpartikel: 5 bzw. 6 nm; British Biocell Ltd., Cardiff, GB oder Aurion N.V., Wageningen, NL) zugegeben und für 15 min bei 30°C und 350 Upm inkubiert. Dann wird der Inhalt des Array-Tubes abgesaugt und durch 500 µl Waschlösung 1 ersetzt, mit der das Array-Tube 10 min bei 30°C und 750 Upm inkubiert wird. Das Array-Tube wird wieder leergesaugt und 500 µl Waschlösung 2 zugegeben und 10 min bei 20°C und 750 Upm inkubiert. Das Array-Tube wird nun zum letzten Mal leergesaugt und gewaschen, indem 500 µl Waschlösung 3 zugesetzt werden und für 10 min bei 20°C und 750 Upm inkubiert wird.

F. Entwicklung des Array-Tubes

[0063] Das Array-Tube-Lesegerät (AT-01, ClonDiag GmbH, Jena bzw. seine Folgeprodukte) wird auf seine Betriebstemperatur von 25°C vorgeheizt und der Grauwert eingestellt. Die Entwicklungslösung (British Biocell, UK oder Aurion, NL) wird präpariert, indem gleiche Volumina von "Initiator"- bzw. "Developer"- und "Enhancer"-Lösung gemischt und für 1 min bei 25°C inkubiert werden. 150 µl dieser Entwicklungslösung werden in das Array-Tube gegeben. Die Entwicklung der Silberfärbung wird beobachtet, indem während eines Zeitraumes von 40 min Bilder des Arrays in 20 sec-Intervallen im Array-Tube-Lesegerät aufgenommen werden.

G. Auswertung des Array-Tubes

[0064] Für jede Sonde auf dem DNA-Array wird die Intensität der Silberfärbungsreaktion ermittelt, wie es in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP 01/07575 (siehe oben) beschrieben ist, das bereits weiter oben zitiert wurde. Basierend auf der relativen Signalintensität für jede Sonde, wird der Status der untersuchten Probe als homozygot Wildtyp (bei ausschließlicher Hybridisierung mit der Sonde mit zum Wildtyp komplementärer Sequenz), homozygot variant (bei ausschließlicher Hybridisierung mit der Sonde mit zum Polymorphismus komplementärer Sequenz) oder als heterozygot (bei Hybridisierung mit beiden, der Wildtyp-spezifischen und der Polymorphismus-spezifischen, Sonde, aber nicht mit den übrigen Sonden des Arrays). Ein typisches Ergebnis einer solchen Hybridisierung im Array-Tube-Format ist in Abb. 1 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 2

Detection of genetic polymorphisms using spotted DNA arrays on glass substrate carriers

MATERIAL AND METHODS

A. List of used buffers

[0065] The buffers are listed in Table 2.

B. Multiplex-PCR-Reaction

[0066] In the PCR reaction for amplification of all alleles, the primers from Table 3 are used. The PCR reaction mix corresponds to the values in Table 4. The conditions for the Multiplex-PCR reaction are shown in the section "b. Reaction mix for the polymerase chain reaction" below.

C. Preparation of DNA Test-arrays on glass substrate carriers

[0067] The probes on the array consist of synthetic single-stranded DNA with a covalently bound Aminolink at the 5'-end (MWG Biotech). The probes are listed in Table 4. The probes were selected so that they represent all four nucleotides at the position of the polymorphism. Each probe is placed on the array as a block of five adjacent spots. The probes are applied to the array using the standard spotting method with a MicroGrid II Microarray Spotter (Biorobotics Ltd., Cambridge, GB) onto glass substrate carriers with epoxy-modified surface.

werden.

[0068] Die Sonden werden als 10 µM-Lösung in einem Puffer aus 150 mM Natriumphosphat, 0.005% (w/v) Natriumdodecylsulfat, pH 8.5 oder 50 mM Natriumphosphat, 0.0025 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, pH 8.5 aufgebracht. Die gespotteten Objektträger werden bei 60°C für 30 min gebacken, um die Amino-modifizierten Sonden kovalent an die Epoxygruppen auf der Glasoberfläche zu binden. Die hergestellten Spots haben einen Durchmesser von circa 150 µm, die Mittelpunkte benachbarter Spots haben einen Abstand von 400 µm.

D. Kontrollspots für die DNA-Test-Arrays auf Glasobjektträgern

[0069] Zusätzlich zu den Sonden, die zur Detektion der genetischen Varianten genutzt werden, weist das Array Kontrollspots auf, die zur Qualitätskontrolle des Spotting und als Markierungen für die Orientierung des Arrays bei der Auswertung dienen. Im einzelnen enthält der Array folgende vier Typen von Kontrollspots:

a. Kontrolle des Fluoreszenzsignals

[0070] Ein Oligonukleotid (Cy3-Sonde, 5'-agagagagagag-3'), das eine 5'-Amino-Modifizierung und eine 3'-Cy3-Markierung aufweist, wird an fünf bis zehn randständigen Positionen des Arrays gespottet. Diese Spots dienen als Kontrolle für die Fluoreszenzdetektion. Das entstehende Spotmuster wird außerdem genutzt, um die Orientierung des Arrays im Lesegerät zu bestimmen.

b. Kontrolle der Effizienz der Polymerasekettenreaktion

[0071] Mit Hilfe amplikonspezifischer Sonden wird überprüft, ob ausreichende Mengen der acht PCR-Produkte gebildet wurden. Die Sequenzen dieser Sonden unterscheiden sich von denjenigen, die zur Detektion der Polymorphismen eingesetzt werden und enthalten keine bekannten Mutationen. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so ausgesucht, daß ihre theoretische Schmelztemperatur 5 bis 8°C über derjenigen der Sonden liegt, die zur Detektion der Polymorphismen eingesetzt werden. Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

c. Kontrolle der Arrayqualität auf dem Glasobjektträger

[0072] Jeder gespottete Slide wird mit der höchstmöglichen Verstärkungsrate im Affimetrix ArrayScanner 428 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) untersucht. Unter diesen Bedingungen ist die Autofluoreszenz der DNA ausreichend, um die Spots sichtbar zu machen und somit ihre Qualität und Morphologie zu beurteilen. Außerdem ist jeder zehnte gespottete Objektträger ein "QMT VisArray Slide" (Quantifoll, Jena, Deutschland), der Spots als dunkelblaue Punkte vor gelbem Hintergrund sichtbar macht.

d. Kontrolle der Hybridisierungsbedingungen

[0073] Die Verwendung der korrekten Hybridisierungstemperatur wird ermittelt, indem zwei der Sonden, aus der Tabelle 7, in derselben Weise verwendet werden, wie es unter der Überschrift "Kontrolle der Hybridisierungsbedingungen" im Abschnitt "D. Kontrollspots für die DNA-Test-Arrays in Array-Tubes" beschrieben wird.

E. Hybridisierung von DNA-Arrays auf Glasobjektträgern

[0074] HybriWells (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland) werden auf die Objektträger geklebt. Anschließend werden die Objektträger in die "Super-Inkubator 3002"-Inkubationskammern (Ogham GmbH, Münster, Deutschland) eingebracht, die vorher im Thermomixer, versehen mit MTP-Block (Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland), auf 30°C vorgeheizt wurden. Die Hybridisierungslösung wird hergestellt, indem 50 µl des PCR-Reaktionsansatzes mit 200 µl des 3DNA-Puffer (Tabelle 2) versetzt und 4 min bei 98°C inkubiert werden. Die Hybridisierungslösung wird in das HybriWell gegeben, das anschließend verschlossen wird. Der so behandelte Objektträger wird für 90 min bei 30°C inkubiert, um den PCR-Produkten die Hybridisierung mit den gespotteten DNA-Sonden auf dem Array zu ermöglichen. Nach der Hybridisierung wird das HybriWell vom Objektträger entfernt und die Objektträger werden, paarweise mit der gespotteten Oberfläche nach außen, für 10 min in ein Färbegefäß mit 100 ml, auf 55°C vorgeheizten, 3DNA-Puffer inkubiert. Die Objektträger werden anschließend dann einmal für 10 min bei 30°C in Waschlösung 1, einmal bei Raumtemperatur in Waschlösung 2 und einmal bei Raumtemperatur in Waschlösung 3 inkubiert und anschließend im Stickstoffstrom oder einer Objektträgerzentrifuge (TeleChem Ltd., Sunnyvale, CA, USA) getrocknet.

F. Detektion von DNA-Arrays auf Glasobjekträgern

[0075] Die Detektion der Fluorszenzsignale erfolgt unter Verwendung des Cyanin3 (Cy3)-Kanals eines Fluoreszenzscanners (Array Scanner 428, Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) bei 570 nm. Das gemessene Spotsignal, in diesem Fall das Cy3-Signal, ist dabei proportional zur Menge der an die korrespondierende Sonde gebundenen Zielmoleküle.

[0076] G. Auswertung von DNA-Arrays auf Glasobjekträgern Für jede Sonde auf dem DNA-Array wird die Intensität des Fluoreszenzsignals mit Hilfe der IcondiClust Software (ClonDiag GmbH, Jena, Deutschland) ermittelt. Basierend auf der relativen Signalintensität für jede Sonde, wird der Status der untersuchten Probe als homozygot Wildtyp (bei ausschließlicher Hybridisierung mit der Sonde mit zum Wildtyp komplementärer Sequenz), homozygot variant (bei ausschließlicher Hybridisierung mit der Sonde mit zum Polymorphismus komplementärer Sequenz) oder als heterozygot (bei Hybridisierung mit beiden, der Wildtyp-spezifischen und der Polymorphismus-spezifischen, Sonde, aber nicht mit den übrigen Sonden des Arrays).

[0077] Ein typisches Ergebnis einer solchen Hybridisierung mit einem Glasobjekträger ist in Abb. 2 dargestellt.

Referenzliste

1. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74: 5260–5264.
2. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 1991;30: 10363–10370.
3. Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH. Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol*. 1992; 29: 213–226.
4. Gailani D, BBroze GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*. 1991; 253: 909–912.
5. Suzuki K, Stenflo J, Dahlbäck B, Teodorsson B. Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. *J Biol Chem*. 1983; 258: 1914–1920.
6. Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C. Protein S modulates factor Xa protection. *J Biol Chem*. 1988; 263: 14884–14890.
7. Vehar GA, Davie EW. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochemistry*. 1980; 19: 401–410.
8. Marlar RA, Kleiss AJ, Griffuin JH. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood*. 1982; 59: 1067–1072.
9. Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood*. 1984; 63: 486–489.
10. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*. 1986; 25: 505–512.
11. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1988; 82: 1236–1243.
12. Pittman DD, Kaufman RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 2429–2433.
13. Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem*. 1991; 266: 20139–20145.
14. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994; 369: 64–67.
15. Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood*. 1995; 85: 607–614.
16. Dahlbäck B. Molecular genetics of venous thromboembolism. *Ann Med*. 1995; 27: 187–192.
17. Dahlbäck B. Molecular genetics of thrombophilia: factor V gene mutation causing resistance to activated protein C as a basis of the hypercoagulable state. *J Lab Clin Med*. 1995; 125: 566–571.
18. Dahlbäck B. Factor V gene mutation causing inherited resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism. *J Intern Med*. 1995; 237: 221–227.
19. Vandebroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet*. 1994; 344: 1453–1457.
20. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation

(Arg306-Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*. 1998; 91: 1140–1144.

21. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; 88: 3698–3703.
22. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1793–1797.
23. Martinelli I, Taioli E, Buccarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 700–703.
24. Aznar J, Vaya A, Estelles A et al. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica*. 2000; 85: 1271–1276.
25. Mira Y, Aznar J, Estelles A, Vaya A, Villa P, Ferrando F. Congenital and acquired thrombotic risk factors in women using oral contraceptives: clinical aspects. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2000; 6: 162–168.
26. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism-pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 809–816.
27. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost*. 1997; 78: 1430–1433.
28. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation*. 1998; 97: 1037–1041.
29. Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem*. 2001; 47: 1597–1606.
30. Witt I. Pathobiochemie und klinisch-chemische Diagnostik der Organ- und Systemerkrankungen: Hämostase- und Fibrinolysesystem. In: Greiling H, Gressner AM, editors. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 1995: 887–944.
31. Kluft C, Jie AF, Sprengers ED, Verheijen JH. Identification of a reversible inhibitor of plasminogen activators in blood plasma. *FEBS Lett*. 1985; 190: 315–318.
32. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 1987; 69: 381–387.
33. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1993; 268: 10739–10745.
34. Eriksson P, Kalllin B, 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 1851–1855.
35. Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AH, Levi M, Buller HR, Peters RJ. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation*. 2001; 104: 3063–3068.
36. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 956–960.
37. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 1996; 84: 431–443.
38. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation*. 1997; 95: 59–62.
39. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnic B, Stare J, Binder BR. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 1998; 79: 975–979.
40. Segui R, Estelles A, Mira Y et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol*. 2000; 111: 122–128.
41. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandebroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1996; 334: 759–762.
42. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 874–877.
43. den Heijer M, Brouwer IA, Bos GM et al. Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels: a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 356–361.
44. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 1991; 48: 536–545.

45. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem.* 2001; 47: 661–666.

46. Jacques PF, Boston AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996; 93: 7–9.

47. Margaglione M, D'Andrea G, d'Addetta M et al. The methylenetetrahydrofolate reductase TT677 genotype is associated with venous thrombosis independently of the coexistence of the FV Leiden and the prothrombin A20210 mutation. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 907–911.

48. Gemmati D, Serino ML, Trivellato C, Fiorini S, Scapoli GL. C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. *Haematologica.* 1999; 84: 824–828.

49. Cattaneo M, Tsai MY, Buccarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignelli M, Mannucci PM. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q506). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1662–1666.

50. Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ, Rosendaal FR. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 254–258.

51. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, Van Den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1044–1051.

52. Weisberg P, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998; 64: 169–172.

53. Sebastio G, Sperandeo MP, Panico M, de Franchis R, Kraus JP, Andria G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathione beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. *Am J Hum Genet.* 1995; 56: 1324–1333.

54. Leclerc D, Campeau E, Goyette P et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbIG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet.* 1996; 5: 1867–1874.

55. Wang XL, Cai H, Cranney G, Wilcken DE. The frequency of a common mutation of the methionine synthase gene in the Australian population and its relation to smoking and coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk.* 1998; 5: 289–295.

56. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8: 825–829.

57. Dekou V, Gudnason V, Hawe E, Miller GJ, Stansbie D, Humphries SE. Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 67–74.

58. Bertina RM, Reitsma PH. A method for screening for the presence of a genetic defect associated with thrombosis and/or poor anticoagulant response to activated protein C. patent EP 0696 325 B1. 1998 May 1998.

59. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

60. Ulvik A, Ueland PM. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real-time PCR: application to SNPs affecting homocysteine and folate metabolism. *Clin Chem.* 2001; 47: 2050–2053.

61. Song L, O'Kane D, Krajnik KL et al. Simplified mutation detection. patent WO 99/36574. Jan 1999.

62. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR, Jr. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem.* 1997; 43: 1749–1756.

63. Southern EM, Mitchell AR. Chromatography of nucleic acid digests on thin layers of cellulose impregnated with polyethyleneimine. *Biochem J.* 1971; 123: 613–617.

64. Niguchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 1992; 10: 413–417.

65. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 189–193.

66. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 5463–5467.

67. Fu DJ, Broude NE, Koster N, Smith CL, Cantor CR. Efficient preparation of short DNA sequence ladders potentially suitable for MALDI-TOF DNA sequencing. *Genet Anal.* 1996; 12: 137–142.

68. Brockmann JM. A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the

study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society* 121, 8044–8051. 1999.

69. Barie N, Rapp M, Ache HJ. UV-crosslinked polysiloxanes as new coating materials for SAW devices with long-term stability. *Sensors and Actuators B* 46, 97–103. 1998.

70. Gauglitz G, Brecht A, Kraus G, Nahm W. Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin multilayers. *Sensors and Actuators B* 11, 21–27. 1993.

71. Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman A, Southern EM. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabeled DNA probes. *Nucleic Acids Research* 25, 4447–4454. 1997.

72. Stomakhin AA, Vasiliskov VA, Timofeev E, Schulga D, Cotter RJ, Mirzabekov AD. DNA sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchips: MALDI mass spectrometry of 5mers contiguously stacked to microchip oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 28, 1193–1198. 2000.

73. van de Rijke F, Zijlmans H, Li S, Vail T, Raap AK, Niedbala RS, Tanke HJ. Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays. *Biotechnology* 19, 273–276. 2001.

74. Sun B, Xie W, Yi G, Chen D, Zhou Y, Cheng J. Microminiaturized immunoassays using quantum dots as fluorescent label by laser confocal scanning fluorescence detection. *Journal Of Immunological Methods* 249, 85–89. 2001.

SEQUENCE LISTING

<110> Ogham GmbH Diagnostics

<120> Thrombose-Chip

<130> 44 648 K

<160> 154

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agaaaaatgat gcccagtgtc taac
24

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ccattattta gccaggagac ctaac
25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tgggatgcag gcttacattg
20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

agtggtatga accccaacaa ctc
23

```
<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
acagaaggc attgatcagt ttgg
24

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
accaggtggt ggattcttaa gtc
23

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
ctctcctgac tgtcatccct attg
24

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cacctggatg ggaaagatcc
20

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
acgatggggc aagtgatg
18
```

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
gtgcatgcct tcacaaagc
19

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
tggggagctg aaggactact acc
23

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
caggatgggg aagtcacagc
20

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
aatagaatat cgaggcatgt ccag
24

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
actcgaccta ccgtcctgtc c
21

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
agcaccgtgg ggatgaag
18

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
cgtggggatg aagtctgtac
20

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
gttgtctgct ccgtctggtt c
21

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
cagcacacct ccaacacctag
20

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
ccacgtgatt gtcttaggttt tgtc
24

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 20
ctacaccagt tttatcatct tttgctc
27

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
aacaagcaaa aatctgttcc taccac
26

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22
tggctccttc aaactcaaca ag
22

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
ttcggcttcc ccgacttag
19

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24
tgtattccttc gcctgtcc
18

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
tgtattcctt gcctgtcc
18

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 26
ctgtattcct tgcctgtcc
19

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
tgtattccta gcctgtcc
18

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28
ctgtattcct agcctgtcc
19

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
tgtattcctg gcctgtcc
18

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 30
tcttaagatt cctggtttc tt
22

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
tcttaagatt cgtggtttc tt
22

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
tcttaagatt catggtttc tt
22

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
tcttaagatt ctgggtttc tt
22

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 34
attgaggctc gctgagag
18

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
attgaggctt gctgagag
18

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 36
attgaggctt gctgagagt
19

<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
attgaggcta gctgagag
18

<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38
attgaggcta gctgagagt
19

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
attgaggctg gctgagag
18

<210> 40
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
gctgactcccc cacgtgt
17

<210> 41
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
ctgactccccc acgtgtc
17

<210> 42
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
ctgactccccc acgtgt
16

<210> 43
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 43
ctgactccccc cacgtgt
17

<210> 44
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
ctgactccac cacgtgt
17

<210> 45
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
gctgactcca ccacgtgt
18

<210> 46
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
ctgactcctc cacgtgt
17

<210> 47
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 47
gctgactcct ccacgtgt
18

<210> 48
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
ctgactccgc cacgtgt
17

<210> 49
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 49
ggctgactcc ccacgt
16

<210> 50
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 50
gctgactccc ccacgt
16

<210> 51
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 51
ggctgactcc accacgt
17

<210> 52
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 52
gctgactcca ccacgt
16

<210> 53
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 53
ggctgactcc tccacgt
17

<210> 54
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 54
gctgactcct ccacgt
16

<210> 55
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55
gctgactccg ccacgt
16

<210> 56
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
atgaaatcgg ctcccc
16

<210> 57
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 57
aaatcggttc ccgcag
16

<210> 58
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 58
gatgaaatcg actcccc
17

<210> 59
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 59
atgaaatcga ctcccc
16

<210> 60
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 60
gaaatcgact cccgcag
17

<210> 61
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 61
aaatcgactc ccgcag
16

<210> 62
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 62
gatgaaaatcg tctcccg
17

<210> 63
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 63
atgaaaatcgt ctcccg
16

<210> 64
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 64
gaaatcgtct cccgcag
17

<210> 65
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 65
aaatcgctc ccgcag
16

<210> 66
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
atgaaatcgc ctcccg
16

<210> 67
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 67
aaatcgccctc ccgcag
16

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 68
aaagacactt tcttcactgg tc
22

<210> 69
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 69
caaagacact ttcttcactg gt
22

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 70
aaagacactt gcttcactgg g
21

<210> 71
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 71
aaagacactt gctctactgg tc
22

<210> 72
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 72
aaagacactt acttcactgg tc
22

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 73
aaagacactt ctttcactgg t
21

<210> 74
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 74
acccttcggg atccac
16

<210> 75
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 75
ttcgggatcc acccc
15

<210> 76
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 76
ccccaatgat ctgcaga
17

<210> 77
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
aaaagccccca cctgga
16

<210> 78
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 78
cccacctgga tgatccac
18

<210> 79
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 79
cccacctgga tgatcca
17

<210> 80
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 80
gcccccacctg gatgatc
17

<210> 81
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 81
cccaatgatc tgcagagg
18

<210> 82
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 82
ccccaatgat ctgcagag
18

<210> 83
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 83
caccccaatg atctgcag
18

<210> 84
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 84
cccagtgtatc tgcagagg
18

<210> 85
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 85
ccccagtgat ctgcagag
18

<210> 86
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 86
caccccaagtg atctgcag
18

<210> 87
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 87
gactcataat ggtcctgtct aata
24

<210> 88
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 88
gagactcata atggtcctgt cta
23

<210> 89
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 89
cataatggtc ctgtctaata tcct
24

<210> 90
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 90
gactcataat gccctgtct aata
24

<210> 91
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 91
actcataatg gccctgtcta ata
23

<210> 92
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 92
actcataatg gccctgtcta at
22

<210> 93
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 93
gagactcata atggccctgt cta
23

<210> 94
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 94
agactcataa tggccctgtc ta
22

<210> 95
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 95
gagactcata atggccctgt ct
22

<210> 96
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 96
gactcataat ggacacctgtct aata
24

<210> 97
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 97
gactcataat ggacacctgtct aat
23

<210> 98
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 98
actcataatg gacacctgtcta ata
23

<210> 99
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 99
gagactcata atggacacctgt cta
23

```
<210> 100
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 100
agactcataa tggacctgtc ta
                22

<210> 101
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 101
gagactcata atggacacctgt ct
                22

<210> 102
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 102
cataatggac ctgtctaata tc tt
                24

<210> 103
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 103
ataatggacc tgtctaataat ctt
                23

<210> 104
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 104
cataatggac ctgtctaata tct
                23
```

<210> 105
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 105
gactcataat gggcctgtct aata
24

<210> 106
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 106
actcataatg ggcctgtcta ata
23

<210> 107
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 107
actcataatg ggcctgtcta at
22

<210> 108
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 108
gagactcata atgggcctgt cta
23

<210> 109
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 109
agactcataa tgggcctgtc ta
22

<210> 110
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 110
agactcataaa tgggcctgtc t
21

<210> 111
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 111
cataatgggc ctgtctaata tctt
24

<210> 112
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 112
ataatgggcc tgtctaataat ctt
23

<210> 113
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 113
ataatgggcc tgtctaataat ct
22

<210> 114
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 114
acttgtccat attcgctggt attac
25

<210> 115
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 115
gtcccaaatg acttcctctg c
21

<210> 116
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 116
ccagaagaaa ttctcagaat ttctg
25

<210> 117
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 117
tccacgtcac tgttagtatgg tctt
24

<210> 118
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 118
gtattactgg ctcttcctga gcc
23

<210> 119
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 119
aaataattct ttcacggat tgg
23

<210> 120
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 120
aacagaggac tcttggtctt tcc
23

<210> 121
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 121
ctctcttgta tcaacaacct tgtc
24

<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 122
ttcacaaagc ggaagaatgt g
21

<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 123
cttcaggtca gcctcaaagc t
21

<210> 124
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 124
gggacttgct cttcaggttag aag
23

<210> 125
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 125
ccactccagc atcactcact tt
22

<210> 126
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 126
accgtgggga tgaagtcgta
20

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 127
ttgtctgctc cgtctggttc
20

<210> 128
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 128
gcggcttcag ggctcaag
18

<210> 129
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 129
cctcaaagta ttcatccttt agatttt
27

<210> 130
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 130
ctaacagctg ggaacactga aaa
23

<210> 131
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 131
gcatcaaaaaa gactcctaag aaggtaaag
29

<210> 132
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 132
gcatcaaaaaa gactcctaag aaggtaaa
28

<210> 133
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 133
gcatcaaaaaa gactcctaag aaggtaa
27

<210> 134
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 134
gcatcaaaaaa gactcctaag aaggta
26

<210> 135
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 135
gcatcaaaaa gactcctaag aaggt
25

<210> 136
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 136
gcatcaaaaa gactcctaag aagg
24

<210> 137
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 137
gcatcaaaaa gactcctaag aag
23

<210> 138
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 138
gcatcaaaaa gactcctaag aa
22

<210> 139
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 139
gcatcaaaaa gactcctaag a
21

<210> 140
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 140
gcatcaaaaa gactcctaag
20

<210> 141
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 141
gcatcaaaaa gactcctaa
19

<210> 142
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 142
gcatcaaaaa gactccta
18

<210> 143
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 143
gcatcaaaaa gactcct
17

<210> 144
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 144
gcatcaaaaa gactcc
16

<210> 145
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 145
ggtgaaaaaca cctcagccaa aaaaa
25

<210> 146
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 146
ggtgaaaaaca cctcagccaa aaaa
24

<210> 147
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 147
ggtgaaaaaca cctcagccaa aaa
23

<210> 148
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 148
ggtgaaaaaca cctcagccaa aa
22

<210> 149
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 149
ggtgaaaaaca cctcagccaa a
21

<210> 150
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 150
ggtgaaaaca cctcagccaa
20

<210> 151
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 151
ggtgaaaaca cctcagcca
19

<210> 152
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 152
ggtgaaaaca cctcagcc
18

<210> 153
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 153
ggtgaaaaca cctcagc
17

<210> 154
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 154
ggtgaaaaca cctcag
16

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen der genetischen Disposition eines Patienten zur Thromboseneigung, gekennzeichnet durch die Untersuchung mindestens zweier Nukleinsäureabschnitte aus dem Genom des Patienten und die anschließende multifaktorielle Auswertung der Untersuchungsergebnisse, wobei die Nukleinsäureabschnitte allelische Polymorphismus umfassen können, deren Vorhandensein im menschlichen Genom mit einer erhöhten Thromboseneigung korreliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Untersuchung mindestens zweier allelischer Polymorphismen aus der folgenden Gruppe: FakV-Leiden; FakV-Cambridge, FakII-G20210A, PAI1-4G/5G, MTHFR-C677T, MTHFR-A1298C, CBSins68bp, MTR-A2756G.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren mindestens einen Schritt der Amplifikation der Nukleinsäureabschnitte umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch eine Ligase-Kettenreaktion.
5. Verfahren nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch eine PCR basierte Amplifikation.
6. Verfahren nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch die Verwendung mindestens einer der Oligonukleotide der Tabelle 3 als Primer.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die PCR basierte Amplifikation unter folgenden Bedingungen erfolgt:
 - i). Denaturierung: 1 Zyklus für 1 bis 15 min bei 92–95°C, vorzugsweise bei 95°C für 15 min
 - ii). Amplifikation: 20 bis 45 Zyklen, vorzugsweise 35 Zyklen
 - Denaturierung 92–95°C, 1 min; vorzugsweise bei 94°C für 1 min
 - Annealing bei 52–62°C, 0,5–4 min; vorzugsweise bei 56°C für 2 min
 - Extension: 68–72°C, 1–5 min; vorzugsweise bei 68°C für 1 min
 - iii). Extension: 1 Zyklus 68–72°C, 5–30 min; vorzugsweise bei 68°C für 5 min.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, gekennzeichnet durch folgenden Reaktionsansätze:
 - a.) Primer: 100 bis 800 nM; vorzugsweise 400 nM humane genomische DNA: 20 bis 250 ng; vorzugsweise 100 ng dNTPS (je): 200 bis 500 µM; vorzugsweise 250 µM Taq-DNA Polymerase: 2,5 bis 10 U; vorzugsweise 5 U 10 X Puffer: 5 µl oder
 - b.) Primer: 100 bis 1200 nM; vorzugsweise 800 nM humane genomische DNA: 20 bis 250 ng; vorzugsweise 100 ng dNTPS (je): 200 bis 500 µM; vorzugsweise 200 µM AccuPrime Taq-DNA Polymerase: 2,5 bis 20 U; vorzugsweise 10 U 10 X Puffer: 5 µl
9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Identifikation der Polymorphismen durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden, die entweder einen Polymorphismus aus der Tabelle 1 oder die jeweilige Wildtypsequenz aufweisen oder dazu komplementär sind.
10. Verfahren nach Anspruch 9 gekennzeichnet durch Oligonukleotide aus der Tabelle 5 als Sonden für die Untersuchung der Polymorphismen oder Wildtypsequenzen.
11. Verfahren einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide auf einem Array oder beads gebunden sind.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gekennzeichnet durch eine Sequenzierung der amplifizierten Nukleinsäureabschnitte zum Nachweis der Polymorphismen.
13. Oligonukleotid mit einer Nukleotidsequenz gemäß einer der Seq.ID. Nr 1 bis 154.
14. Zusammensetzung mit Oligonukleotiden aus der Tabelle 3 als Primer für die Amplifikation Thrombose-relevanter Polymorphismen.
15. Verwendung der Oligonukleotide mit einer Nukleotidsequenz aus der Tabelle 3 als Primer zur Amplifikation eines Nukleinsäureabschnitts, dessen Vorhandensein im menschlichen Genom mit einer erhöhten

DE 102 37 073 A1 2004.02.19

Thromboseneigung korreliert.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1: Thrombophilie-Chip. Ergebnis eines typischen Hybridisierungsexperiments im Arraytube-Format. Die als Probe verwendeten Oligonukleotide waren biotinyliert und wurden durch Kopplung mit Streptavidin-Gold und anschließender Färbung mit elementarem Silber nachgewiesen. Die großen Spots in den Reihen 1 und 12 dienen als Kontrolle für die Silberfärbung und als Positionsmarken für das Gitter zur Auswertung des Arrays. Die auf dem Array verwendeten Allele sind komplementär zu den folgenden Sequenzen:

- J2-J4: MTHFR 677 G (Wildtyp); J5-76: MTHFR 677 A; J8-J10: MTHFR 677 T, J11, I2, I3: MTHFR 677 C;
- I4-I6: MTHFR 1298 T (Wildtyp); I7-I9MTHFR 1298 G;
- I10, I11, H2: PAI1-insG C; H3-H5: PAI1-insG C; H6-8: PAI1-insG A; H9-H11: PAI1-insG G; G2-G4: PAI1-insG-4 Wildtyp.
- G5-7: FII-20210 C (Wildtyp); G8-10: FII-20210 T
- G11, F2, F3: FV-1691 C (Wildtyp); F4-6: FV-1691 T (FV^{Leiden})
- F7-9: FV-R306 C (Wildtyp); F10,F11, E 2: FV-R306 G (FV^{Cambridge})
- E3-5: PAI1-insG-4 (Wildtyp); E6-8: PAI1-insG-5 C
- E9-11: CBS ins68-S1/1; D2-4: CBS ins68-S1/2; D5-7: CBS ins68-S1/3; D8-10: CBS ins68-S2/1 (Wildtyp); D11, C2, C3: CBS ins68-S2/2 (Wildtyp); C4-6: CBS ins68-S2/3 (Wildtyp), C7-9: CBS ins68-S3/1; C10, C11, B2: CBS ins68-S3/2, B3-5: CBS ins68-S3/3
- B6-8: MTR-D919G T (Wildtyp); B9-11: MTR-D919G C; A2-4: MTR-D919G A; A4-6: MTR-D919G G.

Zur besseren Anschaulichkeit wurde die Hybridisierung mit einem Mix synthetischer Proben mit einer Länge von 20-30 bp in einer Konzentration von 1 nM durchgeführt. Diese synthetischen Proben wurden so ausgewählt, daß sie vollständig komplementär zur entsprechenden Wildtyp-Sequenz sind. Mit dem bloßen Auge ist sichtbar, daß die Intensität des Silberfärbungssignals in jedem Fall um mindestens Faktor zwei, in einigen Fällen um mehr als Faktor fünf stärker ist als das der unspezifischen Bindung an die mutierten Sonden. Experimente mit PCR-Produkten aus humanen Blutproben zeigen vergleichbare Signale.

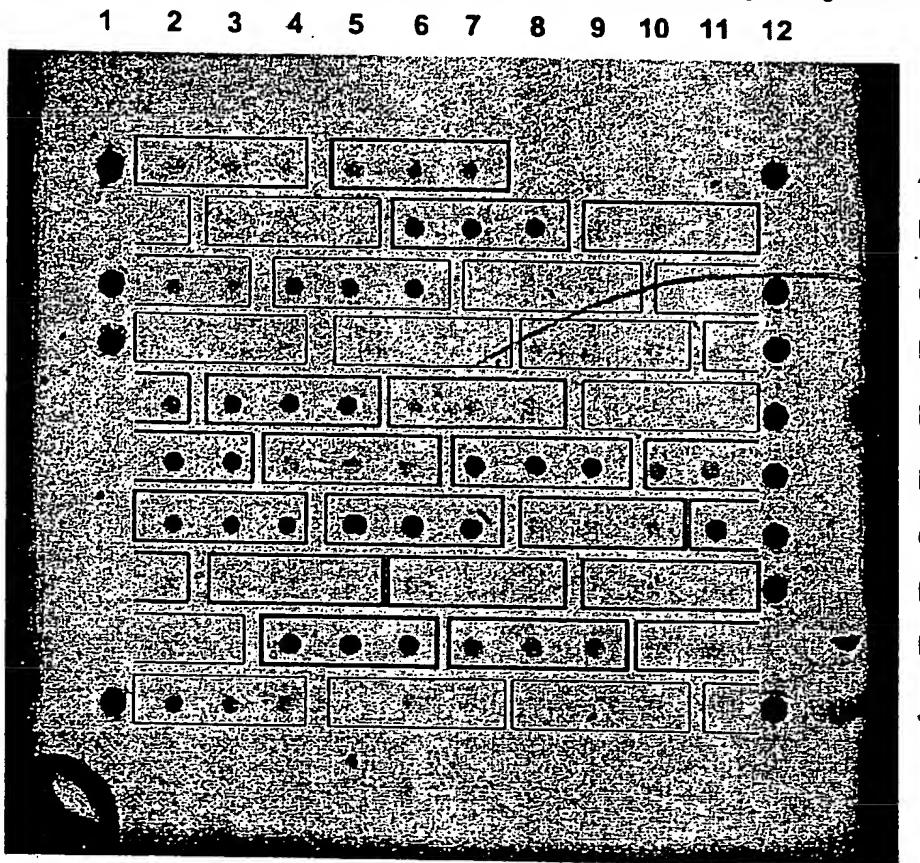


Abbildung 2: Thrombophilie-Chip. Ergebnis eines typischen Hybridisierungsexperiments im Glasobjekträger-Format. Die als Probe verwendeten Oligonukleotide waren biotinyliert und wurden durch Kopplung mit Streptavidin, an das der Fluoreszenzmarker Cy3 gebunden war, nachgewiesen. Die Allele und Kontrollen auf dem Array sind identisch mit der Darstellung in Abbildung 1:

□ J2-J4: MTHFR 677 G (Wildtyp); J5-76: MTHFR 677 A; J8-J10: MTHFR 677 T, J11, I2, I3: MTHFR 677 C;
□ I4-I6: MTHFR 1298 T (Wildtyp); I7-I9MTHFR 1298 G;

□ I10, I11, H2: PAI1-insG C; H3-H5: PAI1-insG C; H6-8: PAI1-insG A; H9-H11: PAI1-insG G; G2-G4: PAI1-insG-4 Wildtyp.

· G5-7: FII-20210 C (Wildtyp); G8-10: FII-20210 T

□ G11, F2, F3: FV-1691 C (Wildtyp); F4-6: FV-1691 T (FV^{Leiden})

□ F7-9: FV-R306 C (Wildtyp); F10,F11, E 2: FV-R306 G ($FV^{Cambridge}$)

□ E3-5: PAI1-insG-4 (Wildtyp); E6-8: PAI1-insG-5 C

· E9-11: CBS ins68-S1/1; D2-4: CBS ins68-S1/2; D5-7: CBS ins68-S1/3; D8-10: CBS ins68-S2/1 (Wildtyp);
D11, C2, C3: CBS ins68-S2/2 (Wildtyp); C4-6: CBS ins68-S2/3 (Wildtyp), C7-9: CBS ins68-S3/1; C10, C11,
B2: CBS ins68-S3/2, B3-5: CBS ins68-S3/3

· B6-8: MTR-D919G T (Wildtyp); B9-11: MTR-D919G C; A2-4: MTR-D919G A; A4-6: MTR-D919G G.

Zur besseren Anschaulichkeit wurde die Hybridisierung mit einem Mix synthetischer Proben mit einer Länge von 20-30 bp in einer Konzentration von 1 nM durchgeführt. Diese synthetischen Proben wurden so ausgewählt, daß sie vollständig komplementär zur entsprechenden Wildtyp-Sequenz sind. Mit dem bloßen Auge ist sichtbar, daß die Intensität des Fluoreszenzsignals in jedem Fall um mindestens Faktor zwei, in einigen Fällen um mehr als Faktor fünf stärker ist als das der unspezifischen Bindung an die mutierten Sonden. Experimente mit PCR-Produkten aus humanen Blutproben zeigen vergleichbare Signale.

